



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0106081
(43) 공개일자 2019년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0027044
(22) 출원일자 2018년03월07일
심사청구일자 2018년03월07일

(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이정수
대전광역시 유성구 노은로 416 송림마을아파트
504동 403호
김철희
대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트 132동
204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영호

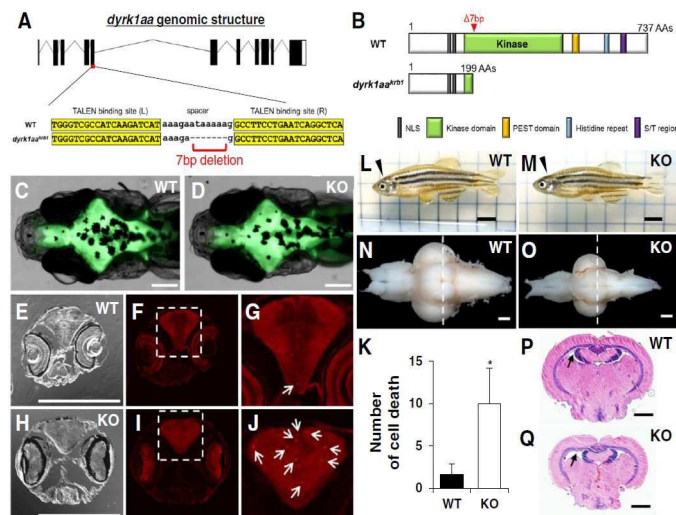
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 DYRK1A 유전자를 녹아아웃시킨 형질전환 동물모델, 및 이를 이용한 신경 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 DYRK1A 유전자를 녹아아웃(knock-out)시킨 형질전환 동물모델, 및 이를 이용한 신경 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법에 대한 것으로, DYRK1A 유전자 녹아아웃 제브라피쉬(zebrafish)를 제작한 결과, 상기 DYRK1A 유전자 녹아아웃 제브라피쉬에서는 뇌세포 사멸이 급증하였고 전체 뇌 크기도 감소하여 소뇌증(microcephaly) 표현형이 나타났으며, 뇌활성도 표지인자인 c-fos 유전자와 스트레스 표지인자인 crh의 발현도 감소하여 뇌신경세포의 활성조절에 문제가 있음을 확인함으로써, 본 발명의 DYRK1A 유전자 녹아아웃 제브라피쉬는 자폐증을 포함한 운동 장애 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Y 207/12001 (2013.01)

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/40 (2013.01)

A01K 2267/0356 (2013.01)

(72) 발명자

조현주

대전광역시 유성구 배울2로 61 대덕테크노밸리10단지아파트 1010동 704호

김옥희

대전광역시 중구 서문로 119 삼익아파트 2동 213호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10063396

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업기술혁신사업

연구과제명 제브라피쉬 기반 유효성, 안전성, 약물성 평가 서비스

기 여 율 1/2

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2016.05.01 ~ 2021.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 CRC-15-04-KIST

부처명 국가과학기술연구회

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 융합연구사업

연구과제명 소동물기반 맞춤형 다중 치매 표현형 검증 시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2015.12.01 ~ 2021.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

DYRK1A 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형질전환 동물은 제브라피쉬(zebrafish)인 것을 특징으로 하는 형질전환 동물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 DYRK1A 유전자가 녹아웃된 것은 DYRK1A 유전자의 엑손 5번에서 2개 이상의 결손을 가지고 있는 것임을 특징으로 하는, 형질전환 동물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 엑손 5번에서 2개 이상의 결손은 엑손 5번에서 연속된 7개(7bp)의 염기서열이 결손된 것임을 특징으로 하는, 형질전환 동물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형질전환 동물은 신경 장애 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 하는, 형질전환 동물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 신경 장애 관련 질환은 자폐증, 지적장애, 및 이상소두증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 형질전환 동물.

청구항 7

DYRK1A 유전자가 녹아웃된 형질전환 수정란.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 수정란은 제브라피쉬(zebrafish)의 수정란인 것을 특징으로 하는, 형질전환 수정란.

청구항 9

DYRK1A 유전자가 녹아아웃된 형질전환 정자.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 정자는 제브라피쉬(zebrafish)의 정자인 것을 특징으로 하는, 형질전환 정자.

청구항 11

- 1) 제 1항의 형질전환 동물에 피검화합물을 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 단계를 포함하는 신경 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법.

청구항 12

- 1) DYRK1A 유전자 녹아아웃(knock-out) 콘스트럭트를 제조하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 수정란에서 DYRK1A 유전자 녹아아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법.

청구항 13

가상의 공간으로 구분된 수조 안에 실험동물을 넣고, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계;

상기 추적한 실험동물의 움직임을 상기 가상의 공간에 따라 구분하여, 상기 구분된 공간별로 머무른 시간 정보를 얻는 단계; 및

상기 얻은 시간 정보를 다른 대조군동물의 시간 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 불안(anxiety) 수준 평가 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 가상의 공간으로 구분된 수조는 수조의 아래부터 위쪽으로 세개의 공간(top, middle, bottom)으로 구분된 수조인 것을 특징으로 하는, 실험동물의 불안(anxiety) 수준 평가 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 실험동물은 유전자가 녹아아웃(knockout)된 제브라피쉬인 것을 특징으로 하는, 실험동물의 불안 수준 평가 방법.

청구항 16

투명한 판에 의하여, 제1볼륨(volume)을 가지는 제1영역과 상기 제1볼륨보다 큰 제2볼륨을 가지는 제2영역으로 구분된 수조를 준비하는 단계;

상기 준비한 수조의 제1영역에 실험동물과 동일한 종의 사회성동물을 2마리 이상 넣고, 상기 준비한 수조의 제2영역에는 실험동물을 넣은 다음, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계;

상기 추적한 실험동물의 움직임을 상기 제2영역 상에서 가상의 공간으로 구분된 2개 이상의 구획에 따라 구분하여, 상기 구분된 구획별로 머무른 시간 정보를 얻는 단계; 및

상기 얻은 시간 정보를 다른 대조군동물의 시간 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 사회성(Social interaction) 수준 평가 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 실험동물은 유전자가 녹아웃(knockout)된 제브라피쉬인 것을 특징으로 하는, 실험동물의 사회성 수준 평가 방법.

청구항 18

동근 바닥모서리를 가지는 수조 안에 2마리 이상의 실험동물을 넣고, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계;

상기 추적한 실험동물의 움직임으로부터, 일정한 시간 간격으로 상기 2마리 이상의 실험동물 사이의 거리 정보를 얻는 단계; 및

상기 얻은 거리 정보를 다른 대조군동물의 거리 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 군집성(shoaling, social cohesion) 수준 평가 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 실험동물은 유전자가 녹아웃(knockout)된 제브라피쉬인 것을 특징으로 하는, 실험동물의 군집성 수준 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DYRK1A 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 동물모델, 및 이의 용도에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 DYRK1A 돌연변이체(mutant) 제브라피쉬(zebrafish)의 자폐증 표현형 검증 및 분석법의 활용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자폐 스펙트럼 장애(Autistic Spectrum Disorder)로도 불리는 자폐증 (autism)은 사회적 소통에 어려움을 겪는 다양한 연속 상에 있는 일련의 지적장애를 통칭하는 말로써 반복적인 행동을 보이거나 특정분야에의 집착 또는 우월성을 보이는 등의 특성에 따라, 자폐성 장애 (Autistic disorder), 아스퍼거 증후군 (Asperger syndrome), 서번트 증후군 (Savant syndrome), 전반적 발달장애 (developmental disorders) 등으로 나뉜다.

[0003] 한국에서 자폐증의 위험성은 특히 높은 것으로 알려져 있으며, 지난 2011년 발표된 전수 역학조사 결과 한국의 ASD의 유병률은 미국의 경우(아동 110명 한 명, 약 1%, CDC 조사결과)에 비해, 한국 7~12세 아동의 2.64%(약 38

명 중 한 명)가 ASD를 가지고 있는 것으로 발표되었다. 이는 미국과 유럽의 2배 이상을 뛰어넘고 있으며 그 수는 더욱 증가할 것으로 예상되고 있다.

[0004] 이러한 ASD의 원인은 현재까지도 명확히 규명되지 않았으나 다양한 유전적 요인과 환경적 요인이 복합적으로 작용할 것으로 생각되고 있다. 그 중 유전적 요인을 찾기 위한 대규모 환자유전체 빅데이터 분석연구가 활발히 진행 중이며, 그 결과 ASD 유발 후보 원인 유전자들이 속속 발굴되고 있다(예를 들어 Yuen et al., Nat. Neurosci. 2017).

[0005] 이에 따라, 발굴된 후보 ASD 원인유전자들의 효율적인 생물학적 자폐성 기능 검증을 위하여, 유전자조작이 용이하고 실험적 접근성이 좋은 자폐성 질환 동물모델 및 신규 기전 연구방법의 개발에 대한 필요성은 점차 증대되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로, DYRK1A 유전자를 녹아웃시킨 형질전환 동물모델, 및 이의 용도를 제공하기 위한 것이며, 더욱 상세하게는 DYRK1A 돌연변이체(mutant) 제브라피쉬(zebrafish)의 자폐증 표현형 검증 및 분석법을 제공하는 것이 목적이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시형태는, DYRK1A 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, DYRK1A 유전자가 녹아웃된 형질전환 수정란이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, DYRK1A 유전자가 녹아웃된 형질전환 정자이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, 1) 제 1항의 형질전환 동물에 피검화합물을 처리하는 단계; 및 2) 상기 단계 1)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 단계를 포함하는 신경 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, 1) DYRK1A 유전자 녹아웃(knock-out) 콘스트럭트를 제조하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)의 수정란에서 DYRK1A 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, 가상의 공간으로 구분된 수조 안에 실험동물을 넣고, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계; 상기 추적한 실험동물의 움직임을 상기 가상의 공간에 따라 구분하여, 상기 구분된 공간 별로 머무른 시간 정보를 얻는 단계; 및 상기 얻은 시간 정보를 다른 대조군동물의 시간 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 불안(anxiety) 수준 평가 방법이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, 투명한 판에 의하여, 제1볼륨(volume)을 가지는 제1영역과 상기 제1볼륨보다 큰 제2볼륨을 가지는 제2영역으로 구분된 수조를 준비하는 단계; 상기 준비한 수조의 제1영역에 실험동물과 동일한 종의 사회성동물을 2마리 이상 넣고, 상기 준비한 수조의 제2영역에는 실험동물을 넣은 다음, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계; 상기 추적한 실험동물의 움직임을 상기 제2영역 상에서 가상의 공간으로 구분된 2개 이상의 구획에 따라 구분하여, 상기 구분된 구획별로 머무른 시간 정보를 얻는 단계; 및 상기 얻은 시간 정보를 다른 대조군동물의 시간 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 사회성(Social interaction) 수준 평가 방법이다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 일 실시형태는, 둥근 바닥모서리를 가지는 수조 안에 2마리 이상의 실험동물을 넣고, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계; 상기 추적한 실험동물의 움직임으로부터, 일정한 시간 간격으로 상기 2마리 이상의 실험동물 사이의 거리 정보를 얻는 단계; 및 상기 얻은 거리 정보를 다른 대조군동물의 거리 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 군집성(shoaling, social cohesion) 수준 평가 방법이다.

[0015] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 DYRK1A 유전자 녹아웃 제브라피쉬(zebrafish)는 운동장애 증상을 갖고, 뇌세포 사멸이 급증하였으며 전체 뇌 크기도 감소하여 소뇌증(microcephaly) 표현형을 발현하는 것으로 나타났으며, 뇌활성도 표지인자인 c-fos 유전자와 스트레스 표지인자인 crh의 발현도 감소하여 뇌신경세포의 활성조절에 문제가 있음이 확인됨으로서, 본 발명의 DYRK1A 유전자 녹아웃 제브라피쉬는 자폐증을 포함한 운동 장애 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 실험동물의 불안성(anxiety), 사회성(Social interaction), 또는 군집성(shoaling, social cohesion) 수준 평가 방법은, 실험동물의 자폐증 관련 여부를 행동학적으로 분석할 수 있는 새로운 자폐 표현형 검증용 에세이(assay)로서, 정상 및/또는 비정상 제브라피쉬의 사회성 검증에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 실험동물에게도 유사하게 포괄적으로 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 소두증과 자폐증이 있는 환자의 DYRK1A 유전자 내의 미세결손을 확인한 사진 및 DYRK1A 유전자 모식도이다. 도 1의 A는 소두증과 자폐증이 있는 11세 환자의 사진이고, 도 1의 B는 상기 환자의 DYRK1A 유전자의 마지막 5번째 엑손에서 21kb의 결실이 있는 영역을 보여주는 21q22.13의 개략도이다.

도 2A는 제브라피쉬 dyrklaa의 유전체 구조를 나타낸 모식도이다. 도 2의 B는 제브라피쉬 dyrklaa의 단백질 구조 및 knockout 돌연변이에 의한 기능상실 단백질 구조이다. 도 2의 C와 D는 각각 수정 후 2주의 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout의 뇌신경계의 크기를 비교한 사진이다. 도 2의 E-K는 수정 후 3주의 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout의 뇌 절편에서의 세포사멸 차이를 Caspase 3 염색으로 비교한 그림이다. 도 2의 L-O는 성체 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout의 뇌 크기를 비교한 사진이다. 도 2의 P-Q는 각각 도 2의 N과 Q의 각각 절편의 H & E 염색 사진이다.

도 3은 제브라피쉬 야생형(WT)과 dyrklaa knockout (KO) 개체의 뇌신경세포에서 뇌활성도 표지인자인 c-fos 유전자(도 3의 A-D)와 스트레스 표지인자인 crh(도 3의 E-H)의 발현 양상을 나타내는 사진이다.

도 4의 A는 성체 제브라피쉬의 불안 (anxiety) 수준을 평가하는 novel tank assay의 모식도이다. 도 4의 B, C는 각각 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 움직임을 연속적으로 관찰하여 tracing한 사진이다. 도 4의 D-F는 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 움직임을 tracing 결과를 수치화한 그래프이다.

도 5의 A는 다른 개체에 대한 관심도를 평가하는 social interaction (사회성) assay의 모식도이다. 도 5의 B, C는 각각 social interaction assay에서 각각 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 개체의 움직임을 tracing한 결과이다. 도 5의 D, E는 social interaction assay에서 각각 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 개체 움직임을 tracing 결과를 수치화한 그래프이다.

도 6의 A는 군집성(shoaling, social cohesion) 에세이 세팅의 모식도이다. 도 6의 B-F는 shoaling assay의 최적화 과정이다. 도 6의 G, H는 제브라피쉬 야생형(WT)과 dyrklaa knockout (KO)의 각각의 군집성 비교실험 및 수치화 결과이다.

도 7은 본 발명에 따라 설립한 dyrklaa KO 제브라피쉬 라인에 대한 기탁증이다(도 7 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시 예를 가질 수 있는 바, 특정 실시 예를 도면에 예시하고 상세한 설명에서 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0020] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0021] 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.
- [0022] 본 발명의 일 실시형태는 DYRK1A 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물이다.
- [0023] 상기 형질전환 동물은 제브라피쉬(zebrafish)인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0024] DYRK1A(Dual Specificity Tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A)는 DYRK 패밀리 중 하나의 유전자로서, 다운증후군에서 발현이 약 1.5배 증가되어 있으며 다운증후군을 유발하는 핵심 원인유전자 중 하나로 알려져있다. 기능적으로 DYRK1A는 신경세포 발생 및 뇌의 크기 조절, 인지능력, 섭식조절과 관련되어 있음이 보고되었으며, 치매와 같은 퇴행성 뇌질환과의 연관성도 알려져 있다. ASD 환자유전체의 대규모 염기서열 분석을 통해 DYRK1A 유전자의 돌연변이가 반복적으로 관찰되어 ASD의 고위험유전자 중 하나로서 ASD와의 관련성이 매우 높을 것으로 생각되고 있다.
- [0025] 그러나, 동물모델로서 마우스를 이용하는 경우, DYRK1A 돌연변이 마우스의 발생이 배아단계에서 중단되는(마우스 배아의 치사율이 높은) 문제점이 있어서, ASD 표현형 관찰이 불가능하였고, 이 때문에 DYRK1A의 ASD의 발병 및 증상에 있어서 개체수준에서의 연관성은 아직 검증되지 않았다.
- [0026] 제브라피쉬(zebrafish)는 발생배가 투명하고, 체외수정을 하며, 수정란을 대량으로 쉽게 확보할 수 있고, 발생이 빨라 대부분의 조직 및 장기가 수정 후 약 5일 내에 형성된다. 또한, 전체 유전체의 염기서열이 확보되어 데이터베이스 검색을 통해 쉽게 접근가능하며, 척추동물로서 인간과 유사한 유전체 구성 (70% 이상)을 가지는 장점을 보이므로, 인간 유전자의 기능분석 및 천연물이나 화합물을 대상으로 생체기능조절물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용되어 왔다. 상기의 장점에 기반하여 형질전환 및 knockout 제브라피쉬 제작 및 이를 이용한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다. 특히 차세대 유전체 편집기술로 각광받고 있는 CRISPR/Cas9 기반 유전체 편집기술의 적용을 통해 제브라피쉬의 knockout, knockin 등의 돌연변이체 제작이 매우 용이해짐으로써 최근 들어 질환 유발 후보유전자의 기능 검증 (loss-of-function)에 널리 활용되고 있는 추세이다.
- [0027] 이에 본 발명자들은 쉽고 빠르게 접근할 수 있는 인간의 질환 모델을 개발하기 위해 노력하던 중, 제브라피쉬의 경우 DYRK1A 유전자에 돌연변이를 일으켜도 무사히 성체까지 자랄 수 있음을 확인한 후, 본 발명을 완성하였다. 자폐유발 후보 유전자 중 하나인 DYRK1A 유전자에 대한 제브라피쉬 knockout 돌연변이체는, 뇌신경계의 일부 뉴런의 세포사멸이 증가되어 뇌크기가 감소되고, 기능이 저하되는 것을 관찰하였으며, 자폐증 관련 신규 행동학적 분석법을 개발하여 사회성이 현저히 감소되어 있음을 확인하였다.
- [0028] 이로써, 제브라피쉬 DYRK1A knockout 돌연변이체가 인간 자폐증 환자가 나타내는 social cognitive impairments 증상과 매우 유사한 신경 장애 증상을 가지고 있음을 객관적으로 검증함과 동시에, 상기 돌연변이체가 인간 자폐증 연구에 널리 활용될 수 있는 신규 모델동물임을 검증하였다.
- [0029] 상기 형질전환 동물은 신경 장애 관련 질환을 갖는 것이 가능하다.
- [0030] 또한, 상기 운동 장애 관련 질환은 외상후 뇌전증을 포함하는 뇌전증, 파킨슨씨 병, 소아성 뇌전증, Miles-Carpenter Syndrome, 정신병, 편두통, 대뇌 빈혈, 알츠하이머 병, 헌팅턴 무도병, 조발성 치매, 강박 반응 이상(OCD), AIDS와 연관된 신경병학적 결함, 수면 장애(불면증 및 수면 발작 포함), 질드라투렛 증후군(Gilles de la Tourette's syndrome)과 같은 경련, 외상성 대뇌 손상, 이명(耳鳴), 신경통, 신경성 통증, 치통, 암 통증, 당뇨병과 같은 질병에서 신경 건강 불량을 유발하는 부적절한 신경 활성화, 다발성 경화증(MS), 운동성 뉴런 질병, 운동실조증, 근경직증(경련성), 측두하악골 관절 기능 장애 및 근 위축성 측색 경화증(ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 상기 신경 장애 관련 질환은 자폐증, 지적장애, 및 이상소두증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 임상 보고서를 바탕으로 소두증과 자폐증이 있는 환자의 DYRK1A 유전자 내의 미세결손을 발견하였고, 이를 바탕으로 다형성 분석(Polymorphism analysis) 및 발현 조직 분석을 통해 DYRK1A 유전자의 변이 및 발현 조직을 확인하였다(실시예 1 및 도 1 참조).
- [0032] 이후, 유전체편집기술인 TALEN을 이용하여 제브라피쉬에서 DYRK1A 유전자가 knockout 된 돌연변이체를 확보하였다. 특히, 제브라피쉬의 경우 DYRK1A 유전자의 엑손 5번에서 2개 이상의 결손을 가지고 있는 것(그 중에서도, 마지막 엑손 5번에서 연속된 7개(7bp)의 염기서열이 결손된 것)이 가장 효율적이었다. 이어서, 확보된 돌연변이

체를 대상으로 아웃-크로싱(out-crossing) 및 인-크로싱(in-crossing) 교배를 통하여, 하나의 안정적인 KO를 dyrk1aa KO 제브라피쉬 라인으로 설립하였고, 이를 dyrk1aa^{krbl}로 명명하였으며, 생명자원센터 KCTC에 기탁번호 BP1294898로 기탁하였다(실시예 2 및 도 2의 A와 B 및 도 7참조).

- [0033] 이에 따르면, 본 발명의 다른 실시형태는, DYRK1A 유전자가 녹아아웃된 형질전환 수정란이고, 상기 수정란은 제브라피쉬(zebrafish)의 수정란인 것이 가능하다. 또한, 본 발명의 다른 실시형태는, DYRK1A 유전자가 녹아아웃된 형질전환 정자이고, 상기 정자는 제브라피쉬(zebrafish)의 정자인 것이 가능하며, 상기 정자는 기탁번호 KCTC BP1294898로 기탁된 것일 수 있다.
- [0034] 또한, 상기와 같이 얻은 DYRK1A 유전자 녹아아웃 제브라피쉬(zebrafish)는 운동장애 증상을 갖고, 제브라피쉬 야생형(wild type)과 비교한 결과 뇌세포 사멸이 급증하였으며 전체 뇌 크기도 감소하여 소뇌증(microcephaly) 표현형을 발현하는 것으로 나타났다(실시예 3 및 도 2의 C-Q 참조).
- [0035] 또한, 뇌활성도 표지인자인 c-fos 유전자와 스트레스 표지인자인 crh의 발현도 감소하여 뇌신경세포의 활성 조절에 문제가 있음을 확인하였다(실시예 4 및 도 3 참조).
- [0036] 이로써, 본 발명의 DYRK1A 유전자 녹아아웃 제브라피쉬는 자폐증을 포함한 운동 장애 질환 관련 약물 스크리닝 방법에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 실시형태는, 1) 제 1항의 형질전환 동물에 피검화합물을 처리하는 단계; 및 2) 상기 단계 1)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 단계를 포함하는 신경 장애 관련 질환 약물 스크리닝 방법이다.
- [0038] 상기 단계 1)의 형질전환 동물은 제브라피쉬인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것이 가능하고, 이에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [0040] 또한, 상기 피검화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0041] 또한, 상기 단계 2)의 피검화합물이 처리된 형질전환 동물을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 방법은 예를 들면, 꼬리 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 방법 또는 녹아아웃 배아의 이상 증상을 육안으로 판별하는 방법 등을 들 수 있으며, 이상 증상을 육안으로 판별하는 것이 용이하다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 실시형태는, 1) DYRK1A 유전자 녹아아웃(knock-out) 콘스트럭트를 제조하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)의 수정란에서 DYRK1A 유전자 녹아아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 동물의 제조방법이다.
- [0043] 또한, 상기 단계 1)의 녹아아웃 콘스트럭트는 유전자 가위를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 유전자 가위는 ZFN(zinc-finger nuclease), TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 및 CRISPR/Cas9(clustered regulary interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 TALEN을 선택하여 사용하였다. 또한, 상기 TALEN을 포함하는 돌연변이 유발 전달체는 DYRK1A를 녹아아웃시키는 것이 바람직하나, DYRK1A 서열 전체 뿐만 아니라 서열의 일부만 녹아아웃된 경우도 모두 포함한다.
- [0044] 또한, 상기 단계 2)의 수정란은 제브라피쉬(zebrafish)의 수정란인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물 유래 수정란을 모두 사용할 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 단계 2)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 방법은 유전자 콘스트럭트를 제조한 후 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 정자를 이용하는 방법(sperm-mediated gene transfer), 바이러스 감염법(viral infection), 직접근육주입법(direct muscle injection), 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존(trnasposon)을 이용한 기법 중에서 적절하게 선택하여 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에서는 발현 백터를 제브라피쉬의 배아에 미세주입법으로 형질전환시켰다.
- [0046] 또한, 상기 단계 3)의 DYRK1A 유전자 녹아아웃 배아를 선별하는 단계는 당업계에 주지된 각종 방법에 따라 선별될 수 있다. 이러한 선별 방법을 예를 들면, 꼬리 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 방법 또는 녹아아웃 배아의 이상 증상

을 육안으로 판별하는 방법 등을 들 수 있으며, 이상 증상을 육안으로 판별하는 것이 바람직하다.

- [0047] 또한, 상기 제조방법의 형질전환 동물은 제브라피쉬인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 형질전환 동물은 운동 장애 관련 질환을 갖는 것이 가능하다.
- [0049] 또한, 본 발명의 방법으로 제조된 형질전환 동물을 야생형과 교배시켜 동형접합 형질전환체를 제조하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0050] 한편, 본 발명자들은 DYRK1A 돌연변이체(mutant) 제브라피쉬(zebrafish)의 자폐증 표현형 검증 및 분석을 위하여,
- [0051] 1) novel tank assay
- [0052] 2) social interaction assay
- [0053] 3) mini-shoaling assay
- [0054] 를 포함하는 새로운 에세이 방법들을 개발하였다.
- [0055] 먼저, novel tank assay 방법은, 가상의 공간으로 구분된 수조 안에 실험동물을 넣고, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계; 상기 추적한 실험동물의 움직임을 상기 가상의 공간에 따라 구분하여, 상기 구분된 공간별로 머무른 시간 정보를 얻는 단계; 및 상기 얻은 시간 정보를 다른 대조군동물의 시간 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 불안(anxiety) 수준 평가 방법이다.
- [0056] 상기 가상의 공간으로 구분된 수조는, 수조의 일측에서 타측으로 2개 이상의 가상의 공간으로 구분된 것일 수 있고, 그 중에서도 수조의 아래부터 위쪽으로 세개의 공간(top, middle, bottom)으로 구분된 수조인 것이 가능하다. 또한, 상기 움직임을 추적하는 것은 카메라 또는 영상 촬영 장치에 의해 구현할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 시간 정보를 얻거나 상기 시간 정보와 비교하는 별도의 소프트웨어, 프로세서, 단말기, 또는 서버 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 실험동물은 제브라피쉬, 또는 유전자가 녹아웃(knockout)된 제브라피쉬일 수 있지만, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 예를 들어, 본 발명은 제브라피쉬를 수조에 넣고, 비디오 카메라를 이용하여 수조의 측면에서 10분간 촬영하는 것이 가능하다. 그리고, 불안증 분석을 위해서 소프트웨어를 이용하여 수조를 가상의 세 부분(top, middle, bottom)으로 나눈 후, 개체의 움직임을 tracing하고, 각 부분에 머무르는 시간을 계상하여 비교할 수 있다. 그래서, 정상개체와 비교하여, 상기 제브라피쉬의 탐색(exploration)행동이 증가하고, 및 수조의 수면가까이 유영하거나 머무는 정도가 크다면, 상기 제브라피쉬는 유전자 기능결손에 의해 변화된 행동 표현형 중 하나로 불안감을 느끼는 수준이 큰 것으로 판단할 수 있다(도 4 참조).
- [0058] 또한, social interaction assay 방법은, 투명한 판에 의하여, 제1볼륨(volume)을 가지는 제1영역과 상기 제1볼륨보다 큰 제2볼륨을 가지는 제2영역으로 구분된 수조를 준비하는 단계; 상기 준비한 수조의 제1영역에 실험동물과 동일한 종의 사회성동물을 2마리 이상 넣고, 상기 준비한 수조의 제2영역에는 실험동물을 넣은 다음, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계; 상기 추적한 실험동물의 움직임을 상기 제2영역 상에서 가상의 공간으로 구분된 2개 이상의 구획에 따라 구분하여, 상기 구분된 구획별로 머무른 시간 정보를 얻는 단계; 및 상기 얻은 시간 정보를 다른 대조군동물의 시간 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 사회성(Social interaction) 수준 평가 방법이다.
- [0059] 상기 투명한 판은 수조 안의 실험동물이 볼 수 있도록 전체 또는 일부분이 투명한 판일 수 있고, 제1영역과 제2영역 사이에서 물이 관통하도록 1개 이상의 구멍을 갖는 것도 가능하다. 또한, 상기 제2영역은 가상의 공간으로 구분된 2개 이상의 구획(바람직하게는 4개의 구획)을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 실험동물, 사회성동물, 대조군동물은 동일한 종에 속하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 움직임을 추적하는 것은 카메라 또는 영상 촬영 장치에 의해 구현할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 시간 정보를 얻거나 상기 시간 정보와 비교하는 별도의 소프트웨어, 프로세서, 단말기, 또는 서버 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 실험동물은 제브라피쉬, 또는 유전자가 녹아웃(knockout)된 제브라피쉬일 수 있지만, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 예를 들어, 본 발명은 수조를 비대칭적인 두 구역으로 정한 후 아크릴판을 삽입하여 물리적으로 분리한 후, 왼쪽 (상대적으로 좁은) 구역에 ‘사회성 신호(cue)’로서 3~4 마리의 제브라피쉬를 넣고, 오른쪽 구역에 실험 대상 (“tester”)인 정상 또는 knockout을 넣어준 다음, 15분간 측면에서 비디오 촬영할 수 있다. 그리고, 행동

분석을 위해서, 오른쪽 구역을 다시 4 개의 세부구역으로 세분한 후, 별도의 소프트웨어를 사용하여 개체의 움직임을 tracing하고 각 세부구역에 머무는 시간을 비교분석하는 것이 가능하다. 그래서, 정상개체와 비교하여, 상기 제브라피쉬가 오른쪽 구역 중에서 아크릴판과 가장 가까운 세부구역에서 활동하는 시간이 가장 적으면, 다른 개체에 대한 관심도가 현저히 떨어진 것으로 보고, 상기 제브라피쉬는 유전자 기능결손에 의해 변화된 행동 표현형 중 하나로 사회성 수준이 낮은 것으로 판단할 수 있다(도 5 참조).

[0061] 또한, mini-shoaling assay 방법은, 둥근 바닥모서리를 가지는 수조 안에 2마리 이상의 실험동물을 넣고, 상기 실험동물의 움직임을 추적하는 단계; 상기 추적한 실험동물의 움직임으로부터, 일정한 시간 간격으로 상기 2마리 이상의 실험동물 사이의 거리 정보를 얻는 단계; 및 상기 얻은 거리 정보를 다른 대조군동물의 거리 정보와 비교하는 단계;를 포함하는, 실험동물의 군집성(shoaling, social cohesion) 수준 평가 방법이다.

[0062] 상기 둥근 바닥모서리를 가지는 수조의 형태나 크기는 특별히 제한되지 않는다. 또한, 상기 움직임을 추적하는 것은 카메라 또는 영상 촬영 장치에 의해 구현할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 거리 정보를 얻거나 상기 거리 정보와 비교하는 별도의 소프트웨어, 프로세서, 단말기, 또는 서버 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 실험동물은 제브라피쉬, 또는 유전자가 녹아웃(knockout)된 제브라피쉬일 수 있지만, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 예를 들어, 본 발명은 둥근 바닥모서리를 가진 bowl을 준비하고 3~7마리의 제브라피쉬를 넣어준 후 위에서 15분 간 비디오 촬영을 진행할 수 있다. 그리고, 10~15 분 사이의 비디오에서 각각 10 초간격의 31개의 고정 이미지를 얻은 후, 이로부터 각 개체 간의 거리변화를 ImageJ를 이용하여 분석하는 것이 가능하다. 그래서, 정상개체와 비교하여, 상기 제브라피쉬 사이의 평균거리가 더 길게 멀리 떨어져 있으면, 군집성이 낮고, 사회성이 결핍된 자폐성을 보이는 것으로 판단할 수 있다(도 6 참조).

[0064] 이러한 본 발명에 따른 실험동물의 불안성(anxiety), 사회성(Social interaction), 또는 군집성(shoaling, social cohesion) 수준 평가 방법은, 실험동물의 자폐증 관련 여부를 행동학적으로 분석할 수 있는 새로운 자폐 표현형 검증용 에세이(assay)로서, 정상 및/또는 비정상 제브라피쉬의 사회성 검증에 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 다른 실험동물에게도 유사하게 포괄적으로 적용 가능하다.

[0065] 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 잘 이해 될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 한정되는 보호범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0066] 실시예 1: ASD 환자에서 DYRK1A의 세포 내 미세결손

[0067] ASD와 소두증 환자에 대한 microarray 분석을 통하여, DYRK1A 유전자 내의 21q22.13, arr[hg 19] (38,865,151-38,885,792) X1 dn에서 de novo 21kb의 미세결손(microdeletion)을 확인하였다.

[0068] 도 1은 소두증과 자폐증이 있는 환자의 DYRK1A 유전자 내의 미세결손을 확인한 사진 및 DYRK1A 유전자 모식도이다. 도 1의 A는 소두증과 자폐증이 있는 11세 환자의 사진이고, 도 1의 B는 상기 환자의 DYRK1A 유전자의 마지막 5번째 엑손에서 21kb의 결실이 있는 영역을 보여주는 21q22.13의 개략도이다.

[0069] 실시예 2: DYRK1A knockout 제브라피쉬 제작

[0070] 먼저, 제브라피쉬 DYRK1A의 유전체정보와 exon/intron 구성에 대한 정보는 Ensembl 데이터베이스를 검색하여 확보하였다(gene ID: ENSDARG00000063570; transcript ID: ENSDART00000100073).

[0071] 그 중에서도, 본 발명자들은 Exon 5번에서 7 base pair 결손을 가진 dyrklaa knockout 제브라피쉬를 2세대 유전체편집기술인 TALEN을 이용하여 제작하였다(도 의 A). 도 2A는 제브라피쉬 dyrklaa의 유전체 구조를 나타낸 모식도이다.

[0072] 구체적으로, 돌연변이 유발을 위한 TALEN은 틀젠에서 합성하였고 그 target site는 5' -tgg gtc gcc atc aag atc at-3' ; right target site: 5' - gcc ttc ctg aat cag gct ca-3' 로 하였다. In vitro transcription으로 합성된 각각 100ng의 TALEN RNA를 수정된 1~2세포기의 제브라피쉬 배아에 미세주입한 후 성체까지 키웠다. 확보된 약 4개월령의 성체는 5' -cca gca aca aga agg aga gg-3' 과 5' -agc cct gat ctt tcc agg tt-3' 한 쌍의 프라이머를 이용하여 95 ° C, 20 초; 59 ° C, 40 초; 72 ° C, 1 분으로 이루어진 35 사이클의 PCR에 이어 5' -tta caa cga cgg cta tga cg-3' 과 5' -ttc atc tcg gtg tgc tgc t-3' 다른 쌍의 프라이머를 이용하여 95 ° C 20 초; 55 ° C, 40 초; 72 ° C, 30 초로 이루어진 25 사이클의 PCR을 수행하였다.

[0073] 그런 다음, agarose gel 상에서 그리고 염기서열분석을 통해서, 4.6%의 효율로 F0 성체 돌연변이체를 확보하였

다(65마리의 founder에서 3 종의 돌연변이체 발굴). 이후, 이것을 야생형(WT) 어류와 일련의 아웃-크로싱(out-crossing)해서 자손을 생산하였고, 이 동물들을 점차 인-크로스해서(in-crossed) homozygous KOs를 얻었다. 이를 통하여, 하나의 안정적인 KO를 dyrk1aa KO 제브라피쉬 라인으로 설립하였고, 이를 dyrk1aa^{krb1}로 명명하였으며, 생명자원센터 KCTC (<http://biorp.kribb.re.kr/>)에 기탁번호 BP1294898로 기탁하였다(도 7 참조).

[0074] 도 2의 B는 제브라피쉬 dyrk1aa의 단백질 구조 및 knockout 돌연변이에 의한 기능상실 단백질 구조이다.

[0075] 여기에 나타난 바와 같이, 상기와 같이 만들어진 dyrk1aa KO 계통은 dyrk1aa의 엑손 5에서 7개의 염기쌍(7bp) 결실로 인해서, 비정상적 조기 종료 코돈을 포함하고 있으며, 키나아제 도메인의 대부분을 포함하는 단백질의 절단과 기능 상실을 초래할 수 있다. 즉, 단백질 서열 상 N-terminal 부위의 일부를 제외하고 대부분의 아미노산의 결손을 유발하여 기능이 거의 상실될 것으로 예상되었다(도 2의 B).

[0076] **실시예 3: DYRK1A knockout 제브라피쉬의 소뇌증(microcephaly) 확인**

[0077] 상기 실시예 2를 통해서 얻은 dyrk1aa KO 제브라피쉬의 소뇌증(microcephaly)을 확인하였다.

[0078] 도 2의 C와 D는 각각 수정 후 2주의 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrk1aa knockout의 뇌신경계의 크기를 비교한 사진이다. 배아 및 라바 시기의 dyrk1aa knockout은 전체적인 몸의 길이나 뇌신경계의 크기에서 유의미한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[0079] 도 2의 E-K는 수정 후 3주의 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrk1aa knockout의 뇌 절편에서의 세포사멸 차이를 Caspase 3 염색으로 비교한 그림이다. 여기에 나타난 바와 같이, 제브라피쉬 정상과 dyrk1aa 돌연변이체의 뇌세포사멸을 비교한 결과, dyrk1aa 돌연변이체에서 뇌세포사멸이 급증하였다. 뇌가 성숙하는 시기인 3주령의 뇌신경의 세포사멸이 knockout에서 현저히 증가해 있는 것으로 보아, 뇌신경의 비정상적 사멸이 성체 knockout에서 보이는 소뇌증의 표현형에 기여할 것으로 생각된다.

[0080] 도 2의 L-O는 성체 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrk1aa knockout의 뇌 크기를 비교한 사진이다. 도 2의 P-Q는 각각 도 2의 N과 Q의 각각 절편의 H & E 염색 사진이다. 제브라피쉬 정상과 dyrk1aa 돌연변이체 성체의 전체 뇌 및 뇌실크기 비교한 결과, dyrk1aa 돌연변이체 성체의 뇌크기는 감소하였고, 뇌실크기는 증가한 것으로 보여진다.

[0081] 이에 따라, 배아 및 라바 시기의 dyrk1aa knockout은 전체적인 몸의 길이나 뇌신경계의 크기 차이가 관찰되지 않았으나, 성체의 경우 정상개체에 비하여 뇌의 크기가 현저히 작은 것을 알 수 있었다.

[0082] **실시예 4: DYRK1A knockout 제브라피쉬의 뇌신경세포 활성 검증**

[0083] 상기 실시예 2를 통해서 얻은 dyrk1aa KO 제브라피쉬의 사회성 감소를 유발하는 한 기전으로서, RNA 마커의 발현의 확인을 통해 뇌신경세포의 활성정도를 정도를 비교분석하였다.

[0084] 7개월령의 제브라피쉬 야생형 및 dyrk1aa knockout 개체의 뇌절편을 확보하기 위하여 뇌를 적출한 후 4% paraformaldehyde에 담귀 4 ° C, overnight동안 보관하여 고정하였다. 이렇게 고정된 뇌조직을 이용하여 DIG labeling kit (Roche)를 이용하여 제작한 c-fos 또는 crh 유전자에 대한 각각의 DIG 표지 RNA probe로 일반적인 whole-mount RNA in situ hybridization 방법을 이용하여 각 유전자의 발현 양상을 확인하였다. 세포사멸의 확인을 위해서는, 고정된 3주령의 뇌조직을 1.5% agar, 5% sucrose에 embedding한 후 냉동절편기에 의해 얻어진 냉동절편을 caspase-3항체 (BD Bioscience)로 면역염색하여 확인하였다.

[0085] 도 3은 제브라피쉬 야생형(WT)과 dyrk1aa knockout (KO) 개체의 뇌신경세포에서 뇌활성도 표지인자인 c-fos 유전자(도 3의 A-D)와 스트레스 표지인자인 crh(도 3의 E-H)의 발현 양상을 나타내는 사진이다.

[0086] 여기에 나타난 바와 같이, 신경세포의 기능적 활성정도를 대변하는 유전자인 c-fos의 성체 뇌에서의 발현을 RNA in situ hybridization 기법을 이용하여 확인한 결과, dyrk1aa knockout 돌연변이체에서 그 발현정도가 현저히 감소되어 있음을 관찰하였다(도 3의 A-D).

[0087] 또한, 격리에 의해 유발되는 스트레스에 의해 발현이 증가되는 crh 유전자 역시 knockout에서의 발현이 현저히 감소되어 있음을 확인하였다(도 3의 E-H).

[0088] 따라서 dyrk1aa knockout 개체의 경우, 다양한 social cue들에 대한 뇌신경세포의 활성조절에 문제가 있으며, 그 결과 상기한 비정상적인 불안반응과 사회성 결핍을 나타내는 것으로 추측할 수 있다.

[0089] **실시예 5: Novel tank assay를 통한 불안증 검증**

[0090] 상기 실시예 2를 통해서 얻은 dyrklaa KO 제브라피쉬에 대하여, Novel tank assay를 통해서 불안증을 검증하였다.

[0091] 7개월령의 제브라피쉬 야생형 및 knockout 개체를 $24 \times 15 \times 15$ cm 크기의 수조에 넣은 후, 비디오 장비 (Sony, HDR-SC190)을 이용하여 측면에서 10 분간 촬영하였다. 불안증 분석을 위해서 EthoVision XT7 소프트웨어 (Noldus)를 이용하여 수조를 가상의 세 부분(top, middle, bottom)으로 나눈 후, 개체의 움직임을 tracing하고, 각 부분에 머무르는 시간을 계상하여 비교하였다. 각 실험은 각각 8마리씩의 개체를 이용하여 독립적으로 수행하였다.

[0092] dyrklaa의 기능결손에 의해 변화된 행동 표현형 중 하나로 불안정도를 검증하기 위하여, 새로운 환경에 적응되어 감에 따라 제브라피쉬 성체가 일반적으로 나타내는 행동인 탐색(exploration)행동과, 수조의 수면가까이 유영하거나 머무는 정도를 정상개체와 knockout 개체를 비교하였다(도 3).

[0093] 도 4의 A는 성체 제브라피쉬의 불안 (anxiety) 수준을 평가하는 novel tank assay의 모식도이다. 도 4의 B, C는 각각 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 움직임을 연속적으로 관찰하여 tracing한 사진이다. 도 4의 D-F는 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 움직임을 tracing 결과를 수치화한 그래프이다.

[0094] 그 결과, knockout 개체의 경우 탐색 행동이 증가하였고, 월등히 수면근처에서 유영하는 행동 양식을 나타냈으며(도 4의 B-F), 이는 knockout 개체의 불안을 느끼는 정도가 현저히 감소해 있음을 실험적으로 검증하고 수치화 할 수 있음을 보여준다.

[0095] **실시예 6: Social interaction assay를 통한 사회성 검증**

[0096] 상기 실시예 2를 통해서 얻은 dyrklaa KO 제브라피쉬에 대하여, Social interaction assay를 통해서 사회성을 검증하였다.

[0097] 즉, 자폐성의 대표적인 표현형인 타 개체에 대한 관심으로 나타나는 사회성을 제브라피쉬 모델동물을 이용하여 검증할 수 있는 신규 social interaction 에세이를 개발하였고, dyrklaa knockout 개체에 적용하여 자폐성을 검증하였다.

[0098] 도 5의 A는 다른 개체에 대한 관심도를 평가하는 social interaction (사회성) assay의 모식도이다. 개체간 상호작용을 통한 사회성 분석을 위해서, 수조를 비대칭적인 두 구역으로 정한 후 아크릴판을 삽입하여 물리적으로 분리한 후, 왼쪽 (상대적으로 좁은) 구역에 '사회성 신호(cue)'로서 3~4 마리의 제브라피쉬를 넣고 오른쪽 구역에 실험 대상 ("tester")인 정상 또는 knockout을 넣어주고 15분간 측면에서 비디오 촬영하였다. 행동분석을 위해서, 오른쪽 구역을 다시 4 개의 세부구역으로 세분한 후, 상기한 소프트웨어를 사용하여 개체의 움직임을 tracing하고 각 세부구역에 머무는 시간을 비교분석하였다.

[0099] 도 5의 B, C는 각각 social interaction assay에서 각각 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 개체의 움직임을 tracing한 결과이다. 도 5의 D, E는 social interaction assay에서 각각 제브라피쉬 야생형(wild type)과 dyrklaa knockout 개체 움직임을 tracing 결과를 수치화한 그래프이다.

[0100] 그 결과, 정상개체의 경우 매우 높은 관심도를 보이며 대부분의 시간동안 zone I 지역에 위치하였으나(도 5의 B, D, E), dyrklaa knockout 개체의 경우 zone I에 대한 선호도가 현저히 감소하였다(도 5의 C, D, E). 즉, 정상개체에 비해 dyrklaa 돌연변이체의 경우 다른 개체에 대한 관심도가 현저히 떨어짐을 확인하였다. 따라서 신규 구축된 social interaction assay의 적용을 통해 dyrklaa knockout의 사회성을 성공적으로 검증하고 수치화 할 수 있었다.

[0101] **실시예 7: Shoaling bowl assay를 통한 군집성 검증**

[0102] 상기 실시예 2를 통해서 얻은 dyrklaa KO 제브라피쉬에 대하여, Shoaling bowl assay를 통해서 군집성을 검증하였다.

[0103] 도 6의 A는 군집성(shoaling, social cohesion) 에세이 세팅의 모식도이다. 포식자로부터 개체군을 보호하거나, 먹이의 확보나 짝짓기를 용이하게 하기 위해서물고기들이 떼를 지어 이동하는 사회적 행동인 shoaling behavior는 전체 물고기 중 중 약 1/4가량에서 (제브라피쉬를 포함하여) 나타나 군집생활을 하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 행동 양식은 사회성 (보다 정확히는 social cohesion)을 검증하는 데에 유용하게 활

용될 수 있다. 이러한 shoaling behavior를 기반으로 신규 사회성 검증 에세이를 구축하였다 .

[0104] 제브라피쉬의 군집성(“social cohesion”)을 이용한 사회성 검증을 위해서 shoaling 행동양식에 기반한 shoaling bowl assay를 최적화하였다. 이를 위하여 윗지름 33cm, 아래지름 24cm, 높이 11cm, 수위 3.2cm이며 둥근 바닥모서리가 4 cm, 3. cm인 bowl을 준비하고 3~7마리의 개체를 넣어준 후 위에서 15 분간 비디오 촬영을 진행 하였다. 10~15 분 사이의 비디오에서 각각 10 초간격의 31개의 고정 이미지를 얻은 후 각 개체간의 거리 변화를 ImageJ를 이용하여 분석하였다.

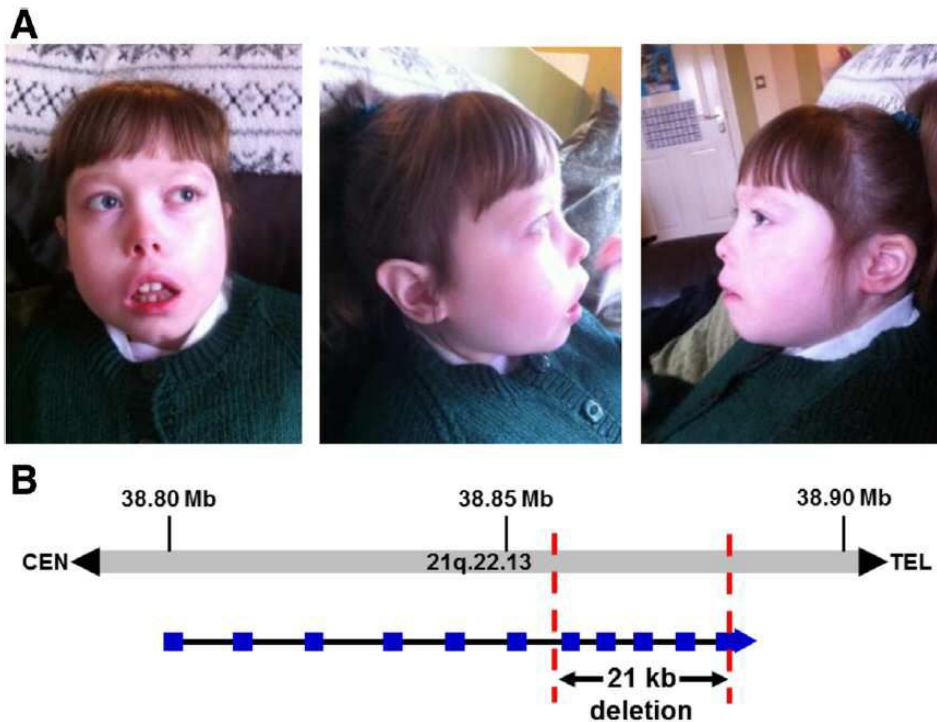
[0105] 도 6의 B-F는 shoaling assay의 최적화 과정이다. 도 6의 G, H는 제브라피쉬 야생형(WT)과 dyrklaa knockout (KO)의 각각의 군집성 비교실험 및 수치화 결과이다.

[0106] 그 결과, 정상 개체의 경우 4cmX3.2cm의 둥근 모서리를 가진 24cm 지름의 bowl에서 3마리로 군집을 이루었을 때 개체 간의 평균거리가 가장 가깝게 유지되고, 수치화된 shoaling behavior가 가장 반복적이며 일관 되게 관찰됨을 확인하였다(도 6의 A-F). 이 에세이를 dyrklaa knockout에 적용하였을 때, 현저한 shoaling behavior의 차이가 관찰되는 것은 상기한 타 social behavior 결손 표현형과 유사한 결과로서 (도 6의 G, H), dyrklaa knockout 개체의 경우 사회성이 심각하게 결핍된 자폐성을 보인다고 할 수 있다.

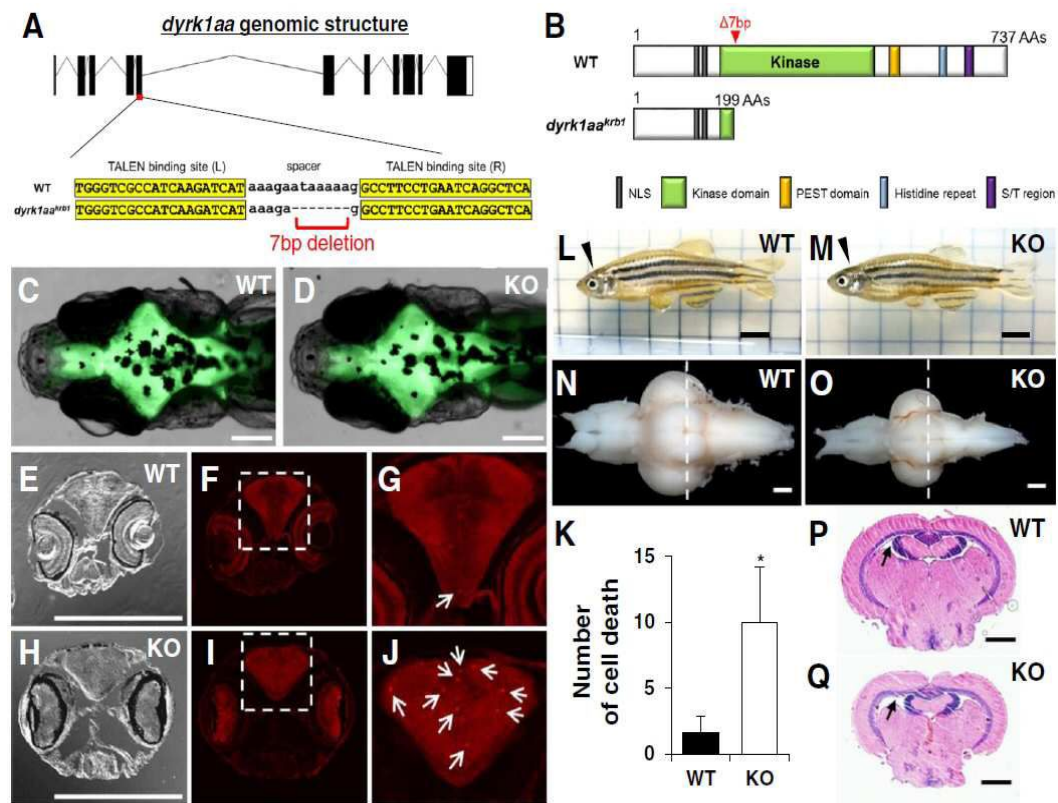
[0107] 상기에서는 본 발명을 특정의 바람직한 실시예에 관련하여 도시하고 설명하였지만, 이하의 특허청구범위에 의해 마련되는 본 발명의 기술적 특징이나 분야를 이탈하지 않는 한도 내에서 본 발명이 다양하게 개조 및 변화될 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 것이다.

도면

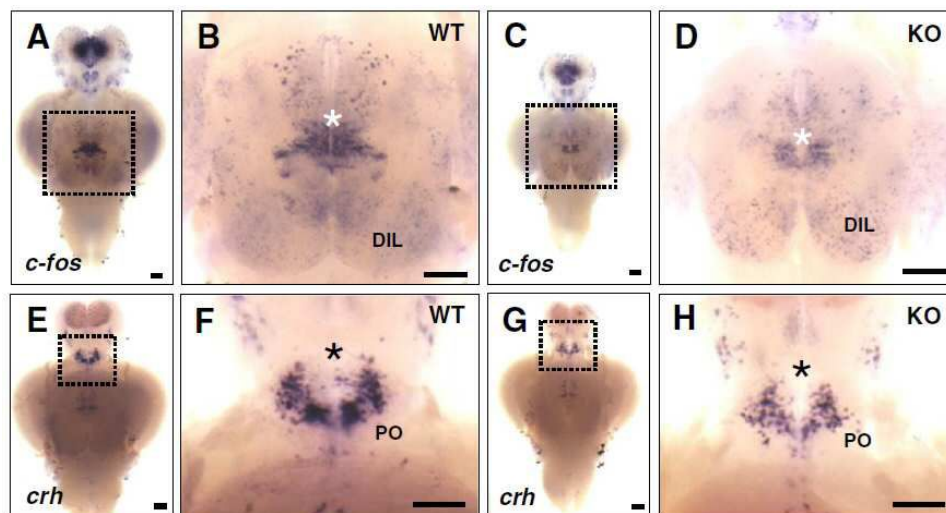
도면1



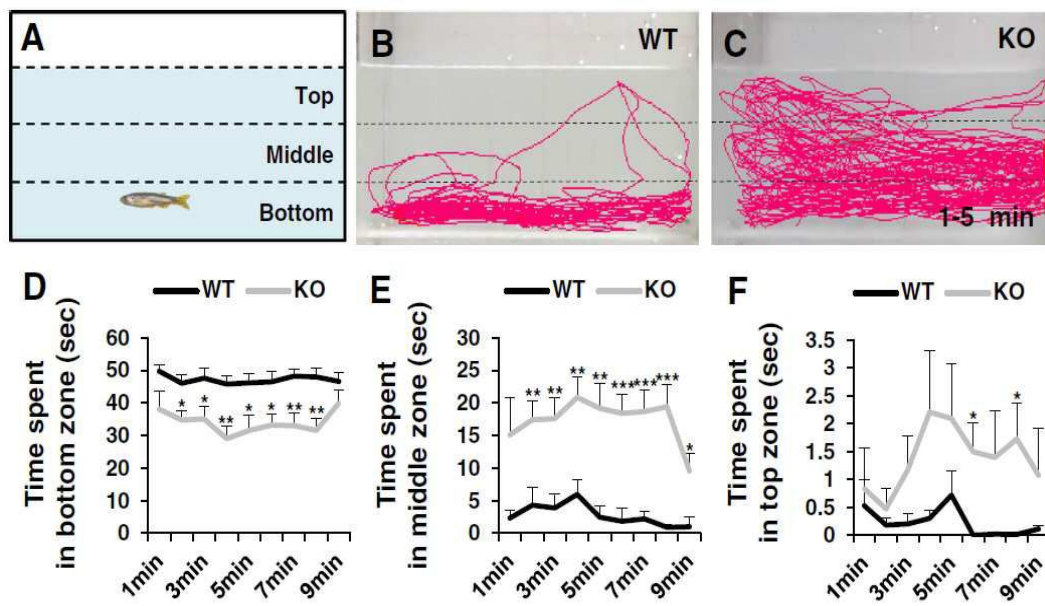
도면2



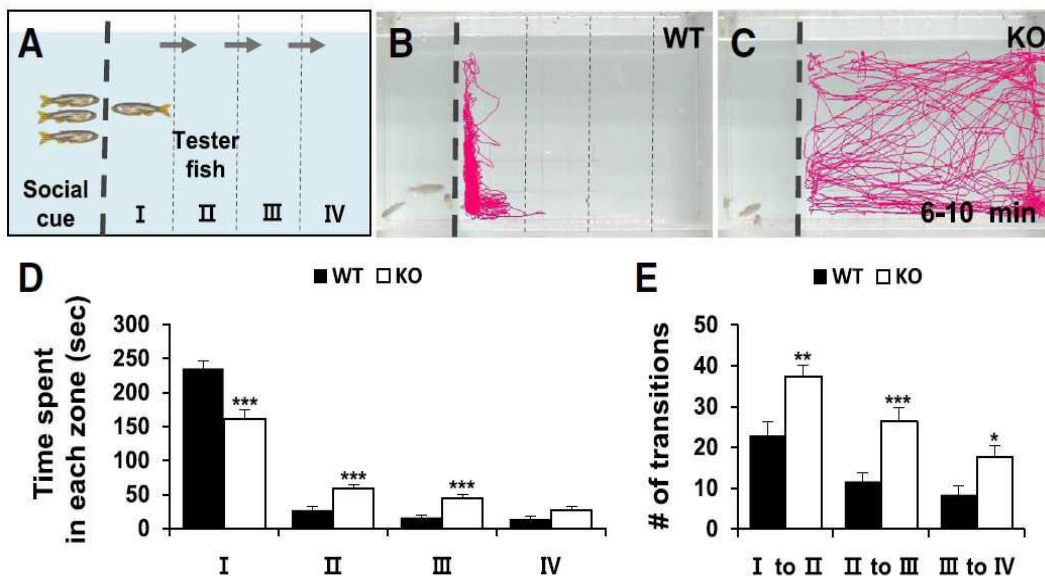
도면3



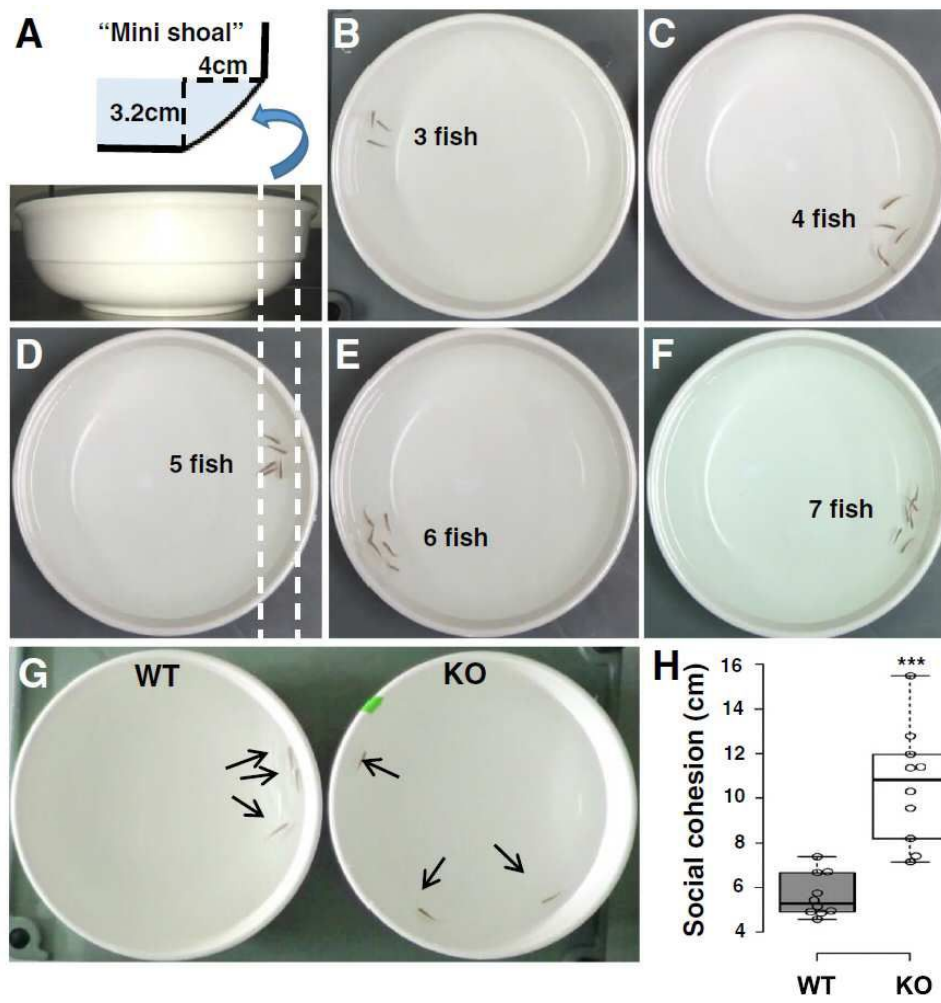
도면4



도면5



도면6



도면7

한국생명공학연구원 생물자원센터 (<http://kctc.kribb.re.kr>) 연구성과물 (<http://biorp.kribb.re.kr>)
 전라북도 정읍시 입신길 181 Tel: 063-570-5602, FAX: 063-570-5609

연구성과물(생물자원) 기탁 필증

기탁번호	BP1294898
연구개발사업명	바이오·의료기술개발
연구과제명	생물자원 및 연구성과물 확보·활용사업
연구기관명	한국생명공학연구원
연구책임자	박두상
기탁명	설치류의동물 1마리
기탁소재 구분	설치류의동물
기탁일자	2016-05-09

귀 기관에서 기탁하신 상기 연구성과물(생물자원)을 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정(대통령령) 개정(2008.5.27 공포) 및 동 규정 시행규칙 개정(2008.7.8 공포)에 따라 상기와 같이 기탁 받았음을 확인합니다.

* 기탁자원에 대한 상세정보는 첨부파일을 확인하시기 바랍니다.

2016 년 5 월 9 일

생물자원 연구성과물전담기관

한국생명공학연구원 생물자원센터장

D. S. Park